第5卷 第1期
1984年 2月

动 物 学 研 究
ZOOLOGICAL RESEARCH

Vol. 5, No. 1
Feb., 1984

# 三刺鲎（Tachypleus tridentatus）血淋巴的研究

## 1. 血蓝蛋白的分离及其免疫原性的研究

## STUDIES ON THE HORSESHOE CRAB (TACHYPLEUS TRIDENTATUS) HEMOLYMPH

## I. SEPARATION AND IMMUNOGENICITY OF HEMOCYANIN

鲎在分类学上属于节肢动物门、剑尾目、鲎科。由于它在古生代寒武纪时期业已出现，故有"活化石"之称。目前世界上已发现有三属五种鲎。我国东南沿海盛产三刺鲎。鲎的血淋巴液中含血蓝蛋白，它是一种高分子量含铜呼吸蛋白，有一定构型，又能与其他分子连接，可作为研究细胞表面分子的标志物（刘藜等，1979）；由于它的分子量很大又可作为免疫原(Malley, A 1965)(Lamy, J 1979)，因此，引起了人们的关注。本文简要报告三刺鲎血蓝蛋白的分离纯化及其免疫原性的研究结果。

材料与方法　从鲎的头胸部与腹部联接处刺破心脏，收集血淋巴液，静置二小时，离心去除凝集的变形细胞，所得上清液对20m$M$ Tris—HCl pH8.5 内含2m$M$ EDTA 的缓冲液透析，以解离血蓝蛋白。经透析过的血淋巴液置入Sephadex G—100柱(2×90cm)，用 20n$M$ Tris—HCl pH8.5 内含 2m$M$ EDTA 和0.1$M$ NaCl的缓冲液洗脱，流速24毫升／小时，每管收集5毫升，340m$M$ 检测，得到血蓝蛋白。将此蛋白再经 DEAE—Sephadex—A50柱(1.5×60cm) 层析，用上述缓冲液配制成0.1—0.4$M$ NaCl 直线梯度洗脱，流速60毫升／小时，每管收集10毫升，340nm和280nm检测，得到血蓝蛋白单体。按Weber和Osborn法（1969），用 SDS 凝胶电泳测定血蓝蛋白亚单位的分子量；标准蛋白为溶菌酶、大豆胰蛋白酶抑制剂，卵白蛋白、牛血清白蛋白。按常规免疫学方法以血蓝蛋白为抗原制备抗血清；用环状试验法测定兔抗血蓝蛋白血清的滴度。按广东中医学院中心实验室方法（1975），以鲎血蓝蛋白为标志抗原，制备兔转移因子，试验兔与兔之间皮肤延迟超敏反应的转移。

结果与讨论　1.三刺鲎血淋巴液经Sephadex G—100柱层析得到三个主要的洗脱峰，称GⅠ、GⅡ、GⅢ。(图1)。这一图谱与Sullivan等（1976）分离大西洋鲎，Takagi等(1980) 分离日本产的三刺鲎血淋巴液的结果相似。根据血蓝蛋白含有铜离子呈现蓝色的特点可判定GⅢ组分为血蓝蛋白。GⅢ再经 DEAE—Sephadex—A50 柱层析得到五个洗脱峰（图2）。Sullivan (1976) 用同样方法分析大西洋鲎的血蓝蛋白认为在这五个洗脱峰中含有八个亚单位；Takai(1980)分析日本产三刺鲎血蓝蛋白得到四个洗脱峰，其中含有六个亚单位。

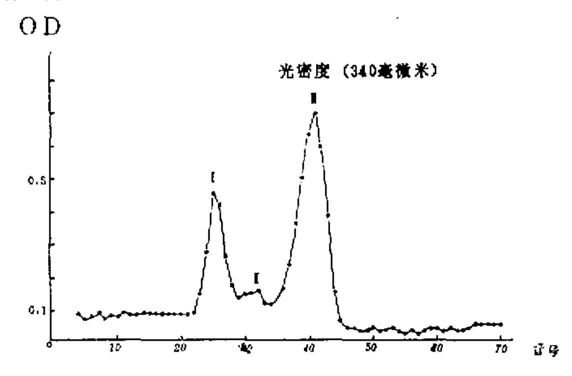
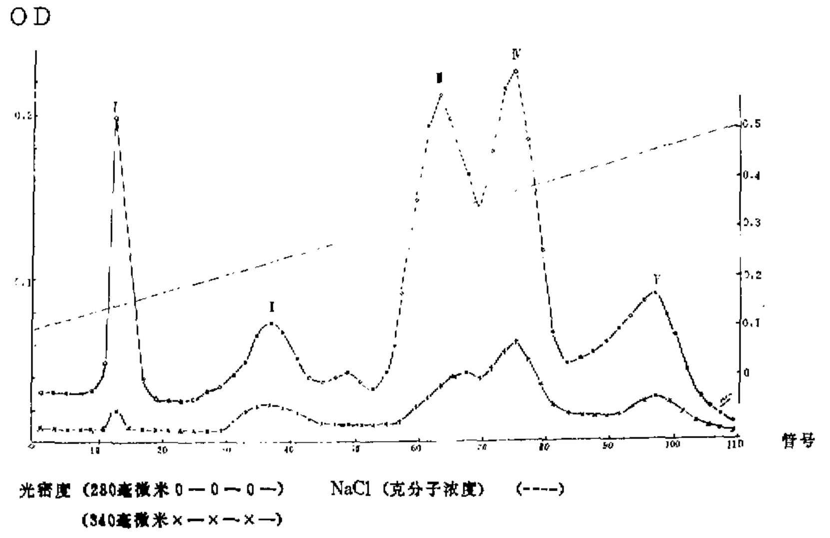



图1　三刺鲎血淋巴液的 Sephadex G—100柱层析图谱

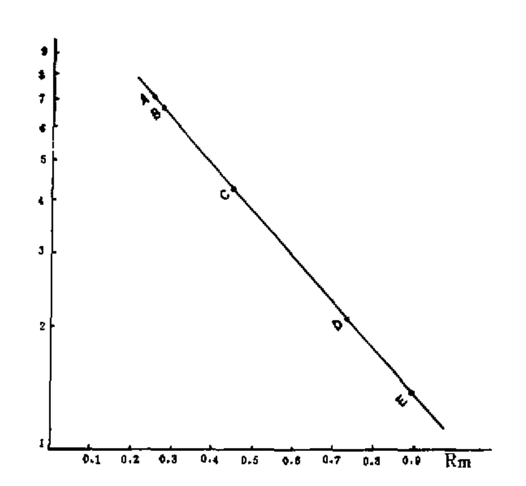
本文1982年6月16日收到，1983年8月15日收到修改稿。




光密度（280毫微米 0—0—0—） NaCl（克分子浓度） （----）
（340毫微米 ×—×—×—）

图 2 三刺鲎血蓝蛋白的DEAE Sephadex A—50柱层析图谱

2.大西洋鲎聚合血蓝蛋白的分子量 Johnson 报告是 3,200,000±4％（Schutter 等 1973），其亚单位分子量为65,000—70,000（Sullivan等1976）。有关三刺鲎聚合血蓝蛋白的分子量未见有报导。我们测定了厦门地区三刺鲎血蓝蛋白亚单位的分子量为 70,000（图 3），日本产三刺鲎血蓝蛋白亚单位分子量Sugita报告为80,000（Sugita 1975），Takagi（1980）报告为70,000。




分子量×$10^4$
A血蓝蛋白 Rm＝0.25 B牛血清白蛋白Rm＝0.27 C卵白蛋白Rm＝0.45
D大豆胰蛋白酶抑制剂Rm＝0.73 E溶菌酶Rm＝0.89

图 3 SDS 凝胶电泳法测定三刺鲎血蓝蛋白亚单位分子量

3.用GⅢ免疫八只家兔，均得到滴度为1:1024的抗鲎血蓝蛋白血清。这一结果与Malley等（1965）用大西洋鲎血蓝蛋白免疫家兔，得到每毫升兔血含4毫克抗血清的结果相类似，均表明鲎血蓝蛋白具有强抗原性。以GⅢ为抗原与兔抗GⅢ血清进行免疫电泳可见5条明显的沉淀弧（图4），表明GⅢ具有五种抗原性不同的成分。

4.取GⅢ多次免疫的家兔脾脏及淋巴结，经Sephadex G—25柱层析，得5个洗脱峰（图5），用Ⅱ峰和Ⅲ峰作兔皮肤延迟超敏反应试验。Ⅱ峰、Ⅲ峰分别注射4只家兔后24小时，GⅢ皮试，其中3只在24小时、72小时均见有直径3mm的肿胀红结节。对照家兔GⅢ皮试未见发红、肿胀现象。这一结果表明Ⅱ峰和Ⅲ峰均有转移延迟超敏反应的作用，从而证明鲎血蓝蛋白可作为标志抗原。

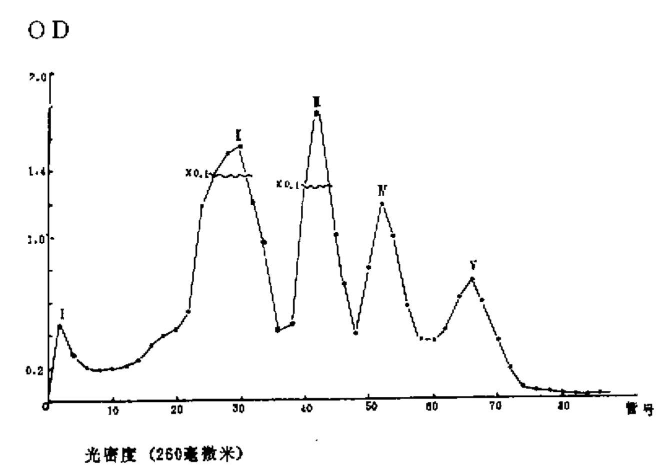



图5　三刺鲎血蓝蛋白免疫的兔脾Sephadex G—25层析图谱

陈厦山　武天爱　汪德耀
（厦门大学细胞学研究室）